

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
CONFÉDÉRATION SUISSE
CONFEDERAZIONE SVIZZERA

PCT/EP 98 / 04427

REC'D 21 SEP 1998

WIPO

PCT

Beschreibung

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

Attestazione

Gli uniti documenti sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Bern, 19. Juni 1998

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Patentgesuche
Demandes de brevet
Domande di brevetto

U. Kohler

Patentgesuch Nr. 1997 1764/97

HINTERLEGUNGSBESCHEINIGUNG (Art. 46 Abs. 5 PatV)

Das Eidgenössische Institut für Geistiges Eigentum bescheinigt den Eingang des unten näher bezeichneten schweizerischen Patentgesuches.

Titel:

Kristalline Säureadditionsalze.

Patentbewerber:
Novartis AG
Schwarzwaldallee 215
4058 Basel

Anmeldedatum: 18.07.1997

Voraussichtliche Klassen: A61K, C07D

Kristalline Säureadditionssalze

Die Erfindung betrifft eine bestimmte Form des Methansulfonsäureadditionssalzes von 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid, welche bestimmte Kristalle umfasst, Verfahren zu deren Herstellung, Arzneimittel, enthaltend diese Kristallform, und deren Verwendung zur diagnostischen oder vorzugsweise therapeutischen Behandlung von Warmblütern, insbesondere Menschen, oder ihre Verwendung zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten zur diagnostischen oder vorzugsweise therapeutischen Behandlung von Warmblütern, insbesondere Menschen.

Hintergrund der Erfindung:

Im Beispiel 21 der EP-A-0 564 409, die am 6. Oktober 1993 veröffentlicht wurde, und in Äquivalentanmeldungen in zahlreichen anderen Ländern ist die Herstellung von 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid und ihre Verwendung, insbesondere als Antitumormittel, beschrieben. Diese Verbindung ist dort lediglich in freier Form (nicht als Salz) exemplifiziert.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass beim Methansulfonatsalz dieser Verbindung eine Kristallform, die nachfolgend als β -Kristallform bezeichnet wird, unter bestimmten Bedingungen gefunden werden kann, die sehr vorteilhafte Eigenschaften hat.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung:

Nachfolgend wird die Erfindung unter Zuhilfenahme von Zeichnungen und weiterer Parameter näher beschrieben:

Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1/3 zeigt das Röntgenbeugungsdiagramm der α -Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I;

Bedingungen ist es jedoch möglich, von 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid-methänsulfonat in einer anderen Kristallform zu erhalten, die nicht nadelförmig ist. Diese Form ist im vorliegenden Text als β -Kristallform bezeichnet.

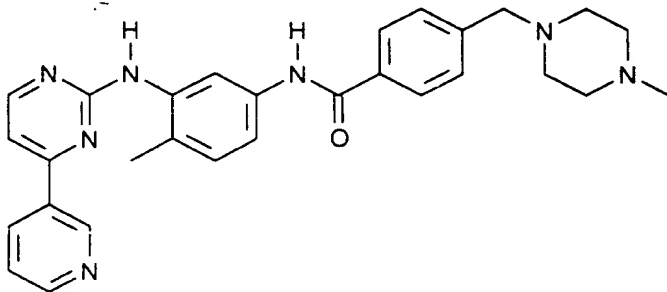
Die β -Kristallform von 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid-methansulfonat hat den Vorteil, dass sie wesentlich günstigere Flusseigenschaften aufweist als die α -Kristallform.

Diese Kristallform hat darüber hinaus den Vorteil, bei Temperaturen unterhalb von 140 °C die thermodynamisch stabilere Form zu sein.

Schliesslich ist die β -Kristallform weniger hygroskopisch als die α -Kristallform und somit auch besser lagerbar und leichter zu verarbeiten.

Die Erfindung betrifft ein Säureadditionssalz einer Verbindung der Formel I in einer Form, welche nicht-nadelförmige Kristalle umfasst., insbesondere eine nicht-nadelförmige Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I.

Die Erfindung betrifft insbesondere eine bestimmte, im wesentlichen reine Kristallform, vorzugsweise die, welche nachfolgend als β -Kristallform bezeichnet wird, des Methansulfonsäureadditionssalzes von 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid der Formel I,



(I)

Dagegen taucht als neuer zusätzlicher Peak der mit (4) in Fig. 2/3 markierte Peak auf. Ausserdem taucht der neue Peak, der in Fig. 2/3 mit (5) markiert ist, auf.

Auch sonst zeigen die Röntgenbeugungsdiagramme deutliche Unterschiede.

Vorzugsweise zeigt das im wesentlichen reine Methansulfonsäureadditionssalz der Verbindung der Formel I in der β -Kristallform das in Fig. 2/3 gezeigte Röntgenbeugungsdiagramm.

(i) Bevorzugt ist eine Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I, welche im Röntgenbeugungsdiagramm nicht den in Fig. 1/3 mit (1) markierten Peak zeigt, wobei die Kristallform vorzugsweise in im wesentlichen reiner Form vorliegt.

(ii) Bevorzugt ist auch eine Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I, welche bei 93 % relativer Luftfeuchtigkeit bei 25 °C noch trocken bleibt, wobei die Kristallform vorzugsweise in im wesentlichen reiner Form vorliegt.

(iii) Die Erfindung betrifft vorzugsweise die β -Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I, die gekennzeichnet ist durch das Vorliegen von Kristallen, welche die in Fig. 3/3 unten gezeigte Form aufweisen; insbesondere die β -Kristallform in im wesentlichen reiner Form.

(iv) Bevorzugt ist die β -Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I, welche einen Schmelzpunkt von unter 225 °C, insbesondere im Bereich zwischen 217 und 225 °C hat.

(v) Bevorzugt ist auch die β -Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I, welche einen Schmelzpunkt von 217 °C, definiert als Schmelzbeginn im DSC-Thermogramm, hat.

(vi) Bevorzugt ist auch die β -Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I, welche im Röntgenbeugungsdiagramm den in Fig. 2/3 mit (4) markierten Peak zeigt.

wie N,N-Dimethylformamid oder -acetamid, oder einem hydrophilen Ether, wie Dioxan, vorzugsweise in Gegenwart von etwas Wasser, oder Gemischen davon, in Suspension bei geeigneter Temperatur, vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 20 und 50 °C, z.B. bei etwa 25 °C, digeriert, oder

b) eine andere Kristallform, insbesondere die α -Kristallform, oder ein amorphes Ausgangsmaterial des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I in einem geeigneten polaren Lösungsmittel, wie insbesondere einem Alkohol, wie Methanol oder Ethanol, einem Keton, wie Aceton, einem N,N-Diniederalkylniederalkancarbonsäureamid, wie N,N-Dimethylformamid oder -acetamid, oder einem hydrophilen Ether, wie Dioxan, oder Gemischen davon, vorzugsweise in Gegenwart von etwas Wasser, bei geeigneter Temperatur auflöst, beispielsweise, nachdem man das Lösungsmittel erwärmt hat, oder unter Erwärmen während des Auflösend, vorzugsweise in beiden Fällen auf 25 °C bis zur Rückflusstemperatur des Reaktionsgemisches, und anschliessend durch Zugabe einer geringen Menge der β -Kristallform als Impfkristall bei geeigneter Temperatur, beispielsweise zwischen 0 und 70 °C, vorzugsweise zwischen 20 und 70 °C, die Kristallisation einleitet.

Die obigen Bedingungen zur zielgerichteten Herstellung der einzelnen Kristallformen sind nicht abschliessend angegeben. Im allgemeinen ist es z.B. möglich, Parameter, wie z.B. das Gewichtsverhältnis des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I zum Lösungsmittel zu variieren. Auch ist es möglich, die für die Herstellung der β -Kristallform benötigte Zeit, insbesondere bei gleichzeitiger Anpassung der angegebenen Temperaturen, zu variieren.

Zu den Vorteilen der β -Kristallform zählt insbesondere die kompaktere Kristallform, die zu wesentlich vorteilhafteren Flusseigenschaften und damit zur besseren Verarbeitbarkeit des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I in der β -Kristallform gegenüber dem in der α -Kristallform führt, beispielsweise bei der Herstellung pharmazeutischer Präparate.

Die α -Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I ist bei Raumtemperatur zwar metastabil. Jedoch ist die β - Kristallform des Methansulfonsäu-

Die geringere Hygroskopie ist ein weiterer Vorteil für die Verarbeitbarkeit und Lagerfähigkeit des Säureadditionssalzes in der β -Kristallform.

Das Methansulfonsäureadditionssalz der Verbindung der Formel I (wie auch 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamid in freier Form) besitzt wertvolle pharmakologische Eigenschaften und kann z.B. als Antitumormittel, als Mittel gegen Atherosklerose, als Mittel gegen Restenose, zur Verhinderung von transplantationsbedingten Erkrankungen, wie der obliterativen Bronchiolitis, und zur Verhinderung der Invasion von bestimmten Bakterien, wie beispielsweise *Porphyromonas gingivalis*, in Zellen von Warmblütern verwendet werden.

Die Phosphorylierung von Proteinen ist seit langem als ein wesentlicher Schritt bei der Differenzierung und Vermehrung von Zellen bekannt. Die Phosphorylierung wird durch Proteinkinasen katalysiert, die man in Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosin-Kinasen unterteilt. Zu den Tyrosin-Kinasen gehört die PDGF (Platelet-derived Growth Factor)-Rezeptor-Tyrosin-Kinase und auch die .

PDGF (Platelet-derived Growth Factor) ist ein sehr häufig vorkommender Wachstumsfaktor, der eine wichtige Rolle sowohl beim normalen Wachstum als auch bei der pathologischen Zellvermehrung spielt, wie bei der Karzinogenese und bei Erkrankungen der glatten Muskelzellen von Blutgefäßen, z.B. bei der Atherosklerose und der Thrombose.

Die Hemmung der PDGF-stimulierten Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität in vitro wird in PDGF Rezeptor Immunkomplexen von BALB/c 3T3 Zellen gemessen, analog wie beschrieben von E. Andrejauskas-Buchdunger und U. Regenass in *Cancer Research* 52, 5353-5358 (1992). Die oben näher bezeichnete Verbindung der Formel I, wie insbesondere ihre β -Kristallform, hemmt die PDGF-abhängige zellfreie Rezeptorphosphorylierung. Die Hemmung der PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase wird in einem Mikrotiter ELISA Assay gemessen (vgl. Trinks et al., *J. Med. Chem.* 37, 1015-27 (1994)). 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamid hemmt die Tyrosinkinase-Aktivität des PDGF-Rezeptors mit einer IC_{50} (Konzentration halbmaximaler Hemmung gegenüber einer

Ausserdem verhindert das Methansulfonsäureadditionssalz der Verbindung der Formel I, wie insbesondere seine β -Kristallform C, die Bildung von Resistenz (multidrug resistance) bei der Krebstherapie mit anderen Chemotherapeutika oder hebt eine bereits gegenüber anderen Chemotherapeutika vorhandene Resistenz auf. Auch unabhängig von dem vorstehend beschriebenen Effekt kann das Methansulfonsäureadditionssalz der Verbindung der Formel I, wie insbesondere seine β -Kristallform, mit Vorteil in Kombination mit anderen Antitumormitteln verwendet werden.

Auch abl-Kinase, insbesondere v-abl-Kinase, wird durch 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid und dessen Methansulfonatsalz inhibiert. Die Hemmung der v-abl-Kinase wird nach den Methoden von N. Lydon et al., Oncogene Research 5, 161-173 (1990) und J.F. Geissler et al., Cancer Research 52, 4492-8 (1992), bestimmt. Dabei verwendet man [Val⁵]-Angiotensin II und [γ -³²P]-ATP als Substrate. 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid zeigt hier eine IC₅₀ von 38 nM.

Analog hemmt das Salz der Verbindung der Formel I auch die BCR-abl-Kinase (siehe Nature Medicine 2, 561-566 (1996)) und ist somit geeignet zur Behandlung BCR-abl-positiver Krebs- und Tumorerkrankungen, wie Leukämien (insbesondere Chronisch-myelogene Leukämie und Akute Lymphoblastische Leukämie, wo insbesondere apoptotische Wirkungsweise gefunden wird), Gliomas, Sarkomas, Ovarialtumoren, und zeigt auch Wirkungen auf die Untergruppe leukämischer Stammzellen und Potential für die Reinigung solcher Zellen in vitro nach Entnahme derartiger Zellen (z.B. Knochenmarksentnahme) und anschliessende Reimplantation der von Krebszellen gereinigten Zellen (z.B. Reimplantation von gereinigten Knochenmarkszellen).

Ausserdem zeigt das Methansulfonsäureadditionssalz der Verbindung der Formel I auch nützliche Effekte bei der Behandlung von durch Transplantation, z.B. allogene Transplantation, entstehenden Krankheitsbildern, vor allem Abstossungsreaktionen, wie insbesondere bei Obliterative Bronchiolitis (OB), d.h. einer chronischen Abstossung von allogenen Lungentransplantaten. Bei Patienten ohne OB findet sich im Gegensatz zu Patienten ohne OB oft ein erhöhter PDGF-Spiegel in den bronchoalveolären Auswaschflüssigkeiten.

weiter mit Zellkultur-Medium verdünnt und für die Experimente in Konzentrationen von 10 bis 0,1 μM verwendet. Für die in-vivo-Verabreichung wird das Methansulfonsäureadditionssalz der Verbindung der Formel I beispielsweise in DMSO mit einer Konzentration von 200 mg/ml gelöst und danach 1:20 mit 1% Tween in 0,9 % Natriumchloridlösung aufgelöst. Nach Ultraschallbehandlung erhält man eine klare Lösung. Die Stammlösungen werden täglich vor der Verabreichung hergestellt. Die Verabreichung wird 24 Stunden vor der Operation vorgenommen. 50 mg/kg des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I wird in einer Dosis pro Tag Ratten i.p. während des gesamten Beobachtungszeitraums verabreicht. Kontrollratten erhalten die gleiche Dosis des Trägers.

Primäre Kulturen glatter Muskelzellen aus der Aorta werden aus 9 bis 11 Tage alten DA (AG-B4, RT1a)-Ratten-Aorten unter Abwandlung der Methode von Thyberg et al. (siehe Differentiation 25, 156-67 (1983)) isoliert. Die Aorten werden der Länge nach geöffnet und die Endothelschicht behutsam abgeschabt. Die Adventitia und die Media werden getrennt, und die Media-Schicht wird mit 0,1 % Kollagenase und DNase in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung während 30 min bei 37 °C verdaut. Die Zellen werden zentrifugiert, in Kulturmedium suspendiert und dürfen dann an Plastikflaschen festwachsen. Die Primärzellen werden nach Passage 2 bis 6 für die Experimente verwendet. Subkulturen werden in DMEM, supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum, 2 mmol/ml Glutamin, 100 mmol/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin, gehalten. Zur Identifikation lässt man die Zellen auf Glas-Deckplättchen wachsen und färbt sie an auf SMC- α -Aktin (s.u.).

Die in-vitro-Quantifizierung der Wanderung der glatten Muskelzellen erfolgt mit einer Transwell Culture Chamber (Costar, Cambridge, MA), deren obere und untere Kulturkammer durch einen Polycarbonat-Filter mit 8 μm -Poren getrennt sind. Die Zellen (100 μl bei einer Konzentration von 1 Million Zellen/ml) werden in der oberen Kammer ausgesetzt. Nach 2 Stunden werden 60 ng/ml PDGF-BB oder PDGF-AA (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY) in die untere Kammer gegeben, supplementiert mit 0,5 % fetalem Kälberserum und 0,1 % Rinderserumalbumin, und die Testverbindung wird in Konzentrationen von 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 und 0,003 μM zugegeben. Zur Messung der Fibronectin-abhängigen Migration werden die Transwell Chambers mit Fibronectin bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ während 24 h bei 4 °C bedeckt (humanes zelluläres Fibronectin, Upstate Biotechnology Inc.). Nach 24 h Migration werden die Filter entfernt, in Methanol fixiert und mit Mayers

BrdU-Markierungsreagenz (ZYMED, San Francisco, CA) i.v. während der postoperativen Stunden 0 bis 72 (insgesamt 6 mal 0.1 ml) verabreicht. Zur Quantifizierung der Proliferation während der anfänglichen Migrationswelle erhalten die Ratten 3 x 0,1 ml BrdU-Markierungsreagens in 8-stündigen Intervallen während der Stunden 72-96 nach der Operation. Zur Quantifizierung der Proliferation am Ende der anfänglichen Migrationswelle erhält eine dritte Gruppe von Ratten 0,3 ml BrdU als Puls drei Stunden vor der Tötung.

Histologische Proben werden in 3% Paraformaldehyd-Lösung während 4 h fixiert zur Paraffin-Einbettung. Morphologische Veränderungen werden aus Paraffin-Schnitten, die mit Mayer's Hämatoxylin-Eosin gefärbt sind, ausgewertet. Die Zellzahlen unterschiedlicher Gefäß-Schnitte werden bei 400-facher Vergrößerung berechnet. Zur Identifikation in Kultur gehaltener Zellen und von Zellen, die innerhalb von vier Tagen nach der Denudations-Verletzung in der Neo-Intima erscheinen, werden mit einem Antikörper gegen α -Aktin aus glatten Muskelzellen (Bio-Makor, Rehovot, Israel) immunhistochemische Färbungen Acetonfixierter Proben vorgenommen. Primäre glatte Muskelzellen werden auf Aceton-fixierten Glas-Deckplättchen mit derselben Färbungsmethode identifiziert. Die Schnitte werden mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:2000) inkubiert, gewaschen und nacheinander mit peroxidase-konjugiertem Kaninchen-Antimaus-Ig und Ziegen-Anti-Kaninchen Ig inkubiert, gefolgt von Behandlung mit Substratlösung mit dem Chromogen 3-Amino-9-ethylcarbazol und Wasserstoffperoxid. BrdU-Färbungen werden aus Paraffin-Querschnitten unter Verwendung eines primären Maus-Antikörpers (Bu20a, Dako, A/S, Dänemark) und des Vectastain Elite ABC-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA) erstellt. Die Schnitte werden deparaffinisiert und bei 500 W mit der Mikrowelle behandelt (2 x 5 min in 0,1 M Zitratpuffer, pH 6), gefolgt von einer Behandlung mit 95 % Formamid in 0,15 M Trinatriumzitat bei 70 °C während 45 min. Antikörperverdünnungen werden nach den Herstellerangaben vorgenommen. Die Schnitte werden mit Mayer's Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt, und positive Zellen werden getrennt für die Intima-, die Media- und die Adventitia-Schichten gezählt.

In behandelten Tieren wird in der Carotis eine signifikante Abnahme der Zellzahl glatter Muskelzellen in der Intima gefunden. Auch in der Adventitia und der Media kann eine signifikante Abnahme der Zellzahl gefunden werden. Durch das Methansulfonsäureadditionssalz der Verbindung der Formel I kann eine leichte Verminderung der absoluten Zahl der BrdU-gefärbten Zellen in der Intima, Media und Adventitia während der ersten zwei Markierungsperioden (0-72 und 72-96 h) gefunden werden, nach 93-96 h findet sich eine

wie auch der Prostata-Karzinome DU145 (ATCC: HTB81) und PC-3 (ATCC: CRL1435); des Blasen-Karzinoms T24 (ATCC: HTB4) und des Epithelialkarzinoms KB31, die in weibliche oder männliche Balb/c-Nacktmäuse transplantiert werden.

Tumore werden erhalten nach subkutaner Injektion von Zellen (Minimum 2×10^6 Zellen in 100 µl phosphatgepufferter physiologische Kochsalzlösung) in die Trägermäuse (4-8 Mäuse pro Zelllinie). Die resultierenden Tumoren werden seriell durch mindestens drei aufeinander folgende Transplantationen geschleust, bevor die Behandlung begonnen wird. Tumorfragmente (ungefähr je. 25 mg) werden s.c. in die linke Flanke der Versuchstiere mittels einer 13-gauge Trocar-Nadel unter Forene-Narkose (Abbott, Schweiz) implantiert. Alle mit Östrogenabhängigen Tumoren transplantierten Mäuse werden zusätzlich mit einem Östrogen-Pellet (1,0 cm eines Röhrchens mit für medizinische Zwecke geeigneter Qualität, Dow Chemicals, mit 5 mg Östradiol, Sigma) versorgt. Die Behandlung wird routinemässig (d.h. bei niedriger oder mittlerer Tumorbelastrung) begonnen, sobald die Tumoren einen mittleren Durchmesser von 100 mm³ erreicht. Das Tumorstadium wird ein- zwei- oder dreimal wöchentlich (abhängig vom Tumorstadium der Tumorzelllinie) und 24 h nach der letzten Behandlung durch Messung der perpendikulären Durchmesser ermittelt. Die Tumorstadien werden gemäss der Formel $L \times D \times p/6$ ermittelt (siehe Evans, B.D., Smith, I.E., Shorthouse, A.J. and Millar, J.J., Brit. J. Cancer, 45: 466-468, 1982). Die Antitumorstärke wird ausgedrückt als T/C% (mittlere Zunahme des Tumorstadiums behandelter Tiere geteilt durch mittlere Zunahme des Tumorstadiums der Kontrolltiere multipliziert mit 100). Tumorstadiumregression (%) repräsentiert das kleinste mittlere Tumorstadium verglichen mit dem mittleren Tumorstadium bei Beginn der Behandlung. Jedes Tier, in dem der Tumor eine Grösse von mehr als 1,5 bis 2 cm³ erreicht, wird getötet.

Die Testverbindung wird einmal täglich während 2 bis 7 aufeinanderfolgenden Wochen entweder p.o. oder i.v. verabreicht.

Das Methansulfonsäureadditionssalz der Verbindung der Formel I wird entweder in sterilem Wasser verdünnt oder in steriler 0,9 %-iger Kochsalzlösung.

Lungen Schwammzellkarzinom NCI-H596	56 (30)	n.t.
Brustkarzinom MDA-MB 231	58 (23)	n.t.

(*) Tägliche Behandlung für die in Klammern angegebene Zahl von Tagen.

Bei den transformierten Zelllinien (v-sis, c-sis und Balb/c AMuLV) werden 1×10^6 Zellen am Tag 0 in die linke Flanke jedes Tieres injiziert ($n = 6/\text{Gruppe}$). Für alle anderen Zelllinien werden Tumorfragmente von etwa 25 mg in die linke Flanke männlicher oder weiblicher Balb/c-Nacktmäuse injiziert ($n = 6/\text{Gruppe}$). Die Behandlung wird begonnen, sobald der Tumor ein mittleres Volumen von 100 bis 150 mm³ erreicht hat, und einmal täglich für die in der Tabelle angegebene Zahl von Tagen erfolgt Verabreichung des Säureadditionssalzes der Formel I. Das Behandlungsende ist immer erreicht, sobald die Placebo-behandelte Gruppe ein mittleres Tumolvolumen von 1,5 bis 2 cm³ erreicht. Die T/C %-Werte werden 24 Stunden nach der letzten Behandlung ermittelt.

Es zeigt sich also stets eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Behandlung von Warmblütern, die an einer der oben genannten Erkrankungen, insbesondere einer Tumorerkrankung leiden, wobei man Warmblütern, die einer solchen Behandlung bedürfen, eine gegen die jeweilige Erkrankung wirksame, insbesondere eine wirksame antiproliferative, insbesondere tumorhemmende Menge der β -Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I verabreicht. Die Erfindung betrifft ausserdem die Verwendung der β -Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I zur Hemmung der oben genannten Tyrosinkinasen, insbesondere PDGF-Rezeptor-Kinase, der v-abl-Kinase und/oder der c-kit-Rezeptor-Kinase oder zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten zur Anwendung zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers. Dabei werden an einen Warmblüter von etwa 70 kg Körpergewicht je nach Spezies, Alter, individuellem Zustand, Applikationsweise und dem jeweiligen Krankheitsbild wirksame Dosen, z.B. tägliche Dosen von etwa 1 - 2500 mg, vorzugsweise 1-1000 mg, insbesondere 5-500 mg verabreicht.

Laufmittel (Gradienten):

HPLC-Gradient:

0 % b) in a) während 20 Minuten., anschliessend 0% → 30% b) in a) in 10 Minuten., anschliessend 30% b) in a) während 5 Minuten.

Laufmittel a): Ionenpaar-Reagenz und Methanol (420 ml + 580 ml)

Laufmittel b): Ionenpaar-Reagenz und Methanol (40 ml + 960 ml)

Ionenpaar-Reagenz: 7.5 g 1-Oktansulfonsäure gelöst in etwa 800 ml Wasser, pH-Wert mit Phosphorsäure auf 2.5 eingestellt und mit Wasser auf 1000 ml verdünnt.

Säule: 150 x 3,9 mm, gefüllt mit Symmetry C18 5 μ (Waters), voräquilibriert mit Laufmittel a).

Flussrate 1,2 ml/min, UV-Detektion bei 267 nm.

Beispiele:

Beispiel 1. Herstellung der β -Kristallform von 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid-methansulfonat - Variante 1

Eine 11%-ige (w/w) Suspension von 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid-methansulfonat in der α -Kristallform wird während zwei Tagen bei etwa 25 °C in Methanol digeriert. Die Kristalle werden durch Filtration auf einem Glasfilter mit G4-Fritte isoliert und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Filterpapier getrocknet. Smp (durch DSC): 217 °C (Beginn des Schmelzens).

Das Ausgangsmaterial, 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid-methansulfonat, wird wie folgt hergestellt:

98.6 g (0.2 mol) freies 4-(4-Methyl-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-phenyl]-benzamid (Herstellung siehe z.B. EP-A-0 564 409) wird in 1.4 l Ethanol vorgelegt. Zu dieser beigen Suspension wird 19.2 gr (0.2 mol) Methansulfonsäure innerhalb von 20 min zugetropft. Die Lösung wird während 20 min am Rückfluss erhitzt und dann bei 65° klar filtriert. Das Filtrat wird zur Hälfte eingeeengt und der Rückstand bei 25 °C abfiltriert (Nutschgut A). Die Mutterlauge wird zur Trockene eingeeengt. Dieser Rückstand und das Nutschgut A werden in 2.2 l Ethanol suspendiert und bei Rückfluss durch Zugabe

Tabletten, enthaltend 20 mg des im Titel genannten Wirkstoffs, werden in folgender Zusammensetzung in üblicher Weise hergestellt:

Zusammensetzung

Wirkstoff	20 mg
Weizenstärke	60 mg
Milchzucker	50 mg
Kolloidale Kieselsäure	5 mg
Talk	9 mg
Magnesiumstearat	1 mg

145 mg

Herstellung: Der Wirkstoff wird mit einem Teil der Weizenstärke, mit Milchzucker und kolloidaler Kieselsäure gemischt und die Mischung durch ein Sieb getrieben. Ein weiterer Teil der Weizenstärke wird mit der 5-fachen Menge Wasser auf dem Wasserbad verkleistert und die Pulvermischung mit diesem Kleister angeknetet, bis eine schwach plastische Masse entstanden ist.

Die plastische Masse wird durch ein Sieb von ca. 3 mm Maschenweite gedrückt, getrocknet und das erhaltene trockene Granulat nochmals durch ein Sieb getrieben. Darauf werden die restliche Weizenstärke, Talk und Magnesiumstearat zugemischt und die Mischung zu Tabletten von 145 mg mit Bruchkerbe verpresst.

Beispiel 5: Tabletten mit 4-[(4-Methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-phenyl]-benzamid methansulfonat, β -Kristallform

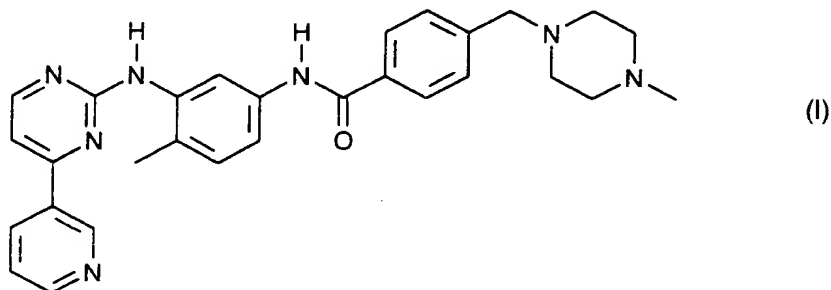
Tabletten, enthaltend 100 mg des im Titel genannten Wirkstoffs, werden in folgender Zusammensetzung in üblicher Weise hergestellt:

Zusammensetzung

Wirkstoff	100 mg
kristalline Laktose	240 mg
Avicel	80 mg

Patentansprüche:

1. Eine Form des Methansulfonsäureadditionssalzes einer Verbindung der Formel I,



welche nicht-nadelförmige Kristalle umfasst.

2. Eine nicht-nadelförmige Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I gemäss Anspruch 1.
3. Eine Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I gemäss einem der Ansprüche 1 und 2, welche im Röntgenbeugungsdiagramm nicht den in Fig. 1/3 mit (1) markierten Peak zeigt.
4. Eine Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I gemäss Anspruch 1 oder 2, welche bei 93 % relativer Luftfeuchtigkeit bei 25 °C noch trocken bleibt.
5. Eine Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I gemäss einem der Ansprüche 2 bis 4 in im wesentlichen reiner Form.
6. Eine Kristallform gemäss einem der Ansprüche 2 bis 4 des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I, welche als β -Kristallform bezeichnet wird.
7. Die β -Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I gemäss Anspruch 6, welche in im wesentlichen reiner Form vorliegt.

16. Verwendung einer Form des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I gemäss einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Tumorerkrankung.

17. Verfahren zur Herstellung der β -Kristallform des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man

a) eine andere Kristallform oder ein amorphes Ausgangsmaterial des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I mit einem geeigneten polaren Lösungsmittel, insbesondere einem Alkohol, wie Methanol oder Ethanol, einem Keton, wie Aceton, einem N,N-Diniederalkylniederalkancarbonsäureamid, wie N,N-Dimethylformamid oder -acetamid, oder einem hydrophilen Ether, wie Dioxan, vorzugsweise in Gegenwart von etwas Wasser, oder Gemischen davon, in Suspension bei geeigneter Temperatur, vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 20 und 50 °C, z.B. bei etwa 25 °C, digeriert, oder

b) eine andere Kristallform oder ein amorphes Ausgangsmaterial des Methansulfonsäureadditionssalzes der Verbindung der Formel I in einem geeigneten polaren Lösungsmittel, wie insbesondere einem Alkohol, wie Methanol oder Ethanol, einem Keton, wie Aceton, einem N,N-Diniederalkylniederalkancarbonsäureamid, wie N,N-Dimethylformamid oder -acetamid, oder einem hydrophilen Ether, wie Dioxan, oder Gemischen davon, vorzugsweise in Gegenwart von etwas Wasser, bei geeigneter Temperatur auflöst, beispielsweise, nachdem man das Lösungsmittel erwärmt hat, oder unter Erwärmen während des Auflösens, vorzugsweise in beiden Fällen auf 25 °C bis zur Rückflusstemperatur des Reaktionsgemisches, und anschliessend durch Zugabe einer geringen Menge der β -Kristallform als Impfkristall bei geeigneter Temperatur, beispielsweise zwischen 0 und 70 °C, vorzugsweise zwischen 20 und 70 °C, die Kristallisation einleitet.

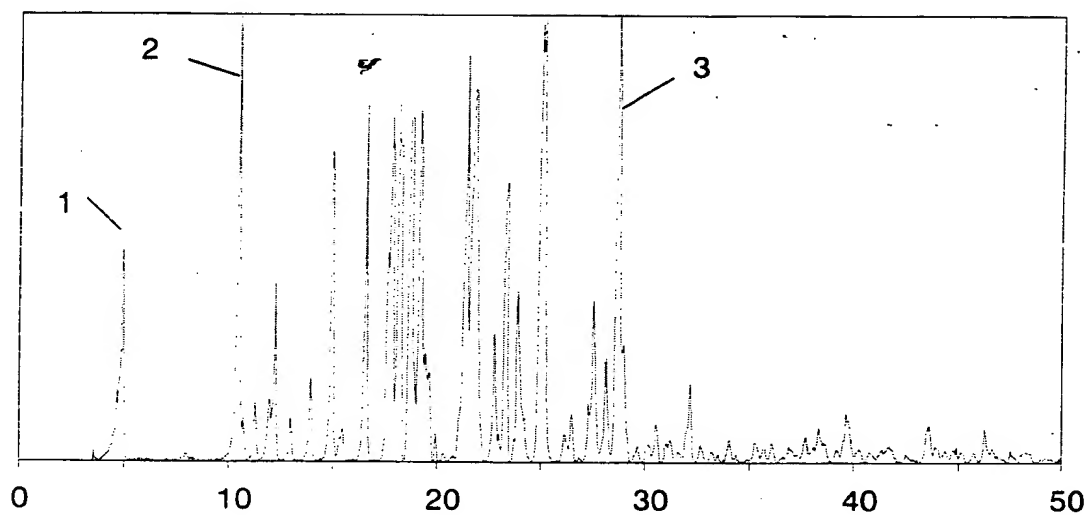


FIG 1/3 (alfa-form)

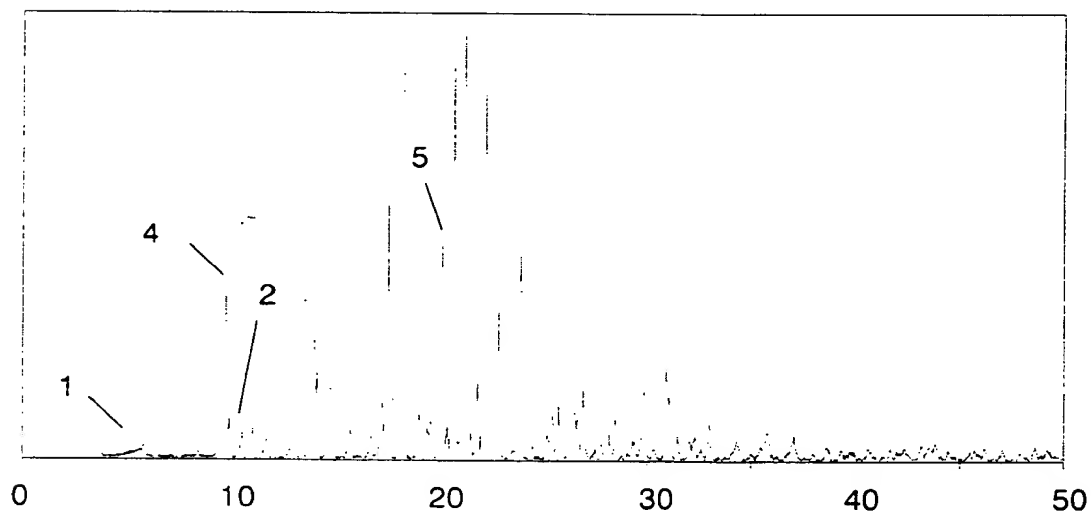


FIG 2/3 (beta-form)

